

星形孢菌素产生菌 H41-38 的发酵工艺条件

蒲小明¹ 林壁润^{1*} 胡美英² 沈会芳¹ 潘群英¹

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所 广东 广州 510640)

(2. 华南农业大学 广东 广州 510640)

摘要: 本研究对菌株 H41-38 发酵生产星形孢菌素的工艺进行了研究。结果表明: 30°C、96 h 为菌株摇瓶培养最适条件。玉米淀粉和酵母粉为最适碳、氮源。采用 Fractional factorial design 方法确定培养基成分的重要因子: 酵母粉和粗盐, 然后利用爬坡路径试验和响应面分析法优化了发酵效价取得最大值时酵母粉和粗盐含量, 发酵效价最大理论值为 252.31 $\mu\text{g/mL}$, 摇瓶实测值为 251.28 $\mu\text{g/mL}$, 其发酵水平比优化前提提高了 4.33 倍。在 30 L 发酵罐(300 r/min、30°C、 $V_{\text{空气}}=10\text{ L/min}\sim 15\text{ L/min}$)中扩大培养 84 h 后发酵效价达到 286.44 $\mu\text{g/mL}$, 比摇瓶培养效价提高了 45.16 $\mu\text{g/mL}$, 其发酵参数变化曲线可指导生产罐的应用生产。

关键词: 星形孢菌素, 部分因子试验, 响应面分析法

Fermentation Conditions of Producing Staurosporine Strain H41-38

PU Xiao-Ming¹ LIN Bi-Run^{1*} HU Mei-Ying² SHEN Hui-Fang¹ PAN Qun-Ying¹

(1. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

(2. South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: This paper focused on staurosporine production by cultivation of strain H41-38. Results could be summarized as follows. The optimal condition for the shake flask cultivation for this strains was 30°C、96 h. Results indicated that the best carbon and nitrogen sources were cornstarch and yeast powder. With the method of fractional factorial design, it was found that yeast powder and crude salt were the important factors, and their optimal contents were determined. Under the optimal conditions, the calculated maximal staurosporine was 252.31 $\mu\text{g/mL}$, while the experimental value of shake flask was 251.28 $\mu\text{g/mL}$. The titer was 4.33 times more than using the original culture medium. After cultivating in a 30 L fermentor(300 r/min、30°C、 $V_{\text{air}}=10\text{ L/min}\sim 15\text{ L/min}$) for 84 h, the titer was 286.44 $\mu\text{g/mL}$, which titer was 45.16 $\mu\text{g/mL}$ higher than the shake flask cultivation, and curves of parameter provided useful information and data for the industrial production of staurosporine.

Keywords: Staurosporine, Fractional factorial design, Response surface analysis

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10A209); 国家自然科学基金项目(No. 30873199); 广东省自然科学基金项目(No. 8151064001000010)

* 通讯作者: Tel: 86-20-87597453; E-mail: linbr@126.com

收稿日期: 2009-04-27; 接受日期: 2009-07-14

目前已开发许多放线菌的次生代谢产物用作抗菌、抗真菌和抗肿瘤药物^[1], 其中 2/3 以上的抗生素分离自陆生放线菌。随着病原微生物和害虫抗药性的提高, 寻找具有新型作用机制的抗生素迫在眉睫, 海洋放线菌作为一种新的微生物资源, 逐渐成为人们研究的热点。

菌株 H41-38 为海洋放线菌, 广东农业科学院植物保护研究所从南海近海泥中分离而来, 其菌丝体提取物对甜菜夜蛾有较高的生物活性^[2], 并分离鉴定主要活性成分为星形孢菌素。据报道, 1977 年 Omura S^[3]等首先从链霉菌 AM-22282 中发现星形孢菌素, 它是一种非特异性的蛋白激酶抑制剂, 能够诱导多种类型的细胞凋亡。目前国内外主要研究星形孢菌素诱导细胞凋亡, 涉及的是医药方面, 且其药物价格昂贵, 广泛应用受到限制, 因此本研究对其产生菌株进行发酵条件的优化研究, 旨在提高星形孢菌素的生产能力, 降低生产成本。国内外关于星形孢菌素发酵工艺的报道仅限于专利, 而且报道很少。Tanida 等^[4]从 120 L 发酵液中获得 1.13 g 星形孢菌素晶体, Omura 等^[5]从 20 L 发酵液中提取得到 110 mg 星形孢菌素, 其平均效价都很低。1990 年 Schroeder 等^[6]培养产生菌 6 d 后发酵效价为 130 $\mu\text{g/mL}$, 生产的成本也较高。本文首先采用逐因子试验方法选择放线菌 H41-38 的发酵培养温度、时间和培养基碳氮源, 再采用部分因子试验 (Fractional factorial design, FFD) 结合响应面分析法 (Response surface analysis, RSA) 优化发酵培养基组分, 并且进行了 30 L 发酵罐培养, 为指导生产发酵提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

放线菌 H41-38 由广东省农业科学院植物保护研究所提供, 现保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC M 206087。

1.2 培养基

改良高氏一号培养基: KNO_3 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, MgSO_4 0.1%, 粗盐(主要成分为氯化钠, 含有氯化镁等杂质) 0.3%, 可溶性淀粉 2%, 琼脂粉 1.6%, 水 1000 mL, pH 7.2~7.4;

初始发酵培养基: 蔗糖 30 g, 大豆蛋白粉 40 g, 粗盐 3 g, CaCO_3 2 g, KNO_3 2 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.66 g,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.03 g, pH 7.2~7.4, 水 1000 mL; 发酵培养基每 50 mL 分装于 250 mL 三角瓶中, 用 8 层纱布封口, 外用牛皮纸和棉线捆紧。以上均 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3 试剂和仪器

星形孢菌素 (Staurosporine) 标准品 (美国 Sigma 公司), 纯度 99%; 美国 Waters Delta 600 型高效液相色谱仪, 色谱柱为 Waters Sun FireTM C₁₈ 柱 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); Biostatc 30 L 生物发酵罐 (德国贝朗公司)。

1.4 星形孢菌素 HPLC 检测方法^[7]

检测波长 292 nm, 流动相比比例为甲醇: 水 = 80:20 (V/V), 流动相流速 0.5 mL/min, 进样量 10 μL , 柱温 40 $^\circ\text{C}$ 。标准曲线: $Y = 50580X + 135557$, $R^2 = 0.9999$, 线性范围: 7.78 $\mu\text{g/mL}$ ~500 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.5 培养温度选择

设定 28 $^\circ\text{C}$ 、30 $^\circ\text{C}$ 和 32 $^\circ\text{C}$ 3 个温度, 选择初始发酵培养基, 摇床转速 160 r/min。在时间段 36 h~144 h 内, 每隔 12 h 取样 1 次, 每次取样 3 瓶, 测定菌丝干重。用 90% 乙醇 ($V_{\text{溶剂}}/V_{\text{发酵液}} = 1:1$) 振荡浸泡菌丝 6 h, 过滤得浸泡液, HPLC 测定其中有效成分含量, 计算每毫升发酵液中星形孢菌素含量。根据星形孢菌素含量选择合适的发酵培养温度。

1.6 发酵培养基成分优化

1.6.1 碳氮源因子的选择: 碳源分别选择可溶性淀粉 20 g、葡萄糖 20 g、蔗糖 20 g、玉米淀粉 20 g 和米粉 20 g, 无碳源为对照处理; 氮源分别选择大豆蛋白粉 20 g、蛋白胨 20 g、鱼粉 20 g、酵母粉 20 g、玉米浆 20 g 和牛肉膏 20 g, 无氮源为对照处理。培养条件 (30 $^\circ\text{C}$, 160 r/min, 96 h)。每处理 3 个重复, HPLC 测定含量, 计算平均值。

1.6.2 FFD 优化培养基组分: 发酵培养基的 8 个组分, 即玉米淀粉 (X_2 : Cornstarch)、酵母粉 (X_3 : Yeast powder)、粗盐 (X_5 : Crude salt)、 CaCO_3 (X_6)、 KNO_3 (X_8)、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (X_9)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_{11})、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_{13}), 其它因子 X_1 、 X_4 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{12} 为空项 (误差估计), 每个因素设高、低 2 个水平。每处理 3 个重复, HPLC 测定发酵液中星形孢菌素含量, 计算平均值。

1.6.3 爬坡路径试验: 考察重要因子含量变化对发酵单位的变化趋势, 增加正影响因子在培养基中的浓度, 每次增加 0.5%; 减少负影响因子在培养基中

的浓度, 每次减少 0.05%。每处理 3 个重复。

1.6.4 响应分析法: 由爬坡路径试验得到培养基中重要影响因子接近最大响应值的含量, 从而进行响应面优化分析。每处理 3 个重复, 计算平均值。运行 SAS 程序建立响应变量与自变量的响应面回归模型, 推测出响应变量的最大值以及获得此最大值时自变量的取值。模型表述为: $Y = b_0 + \sum b_i(1)x_i + \sum b_i(2)x_i^2 + \sum b_{ij}x_ix_j, i = 1, N; j = 1, N; i \neq j$, 其中 Y 为预测响应值, 即星形孢菌素含量, b_0 为截距, $\sum b_i(1)$ 为线性系数, $b_i(2)$ 为方次系数, b_{ij} 为交互系数。

1.6.5 优化验证试验: 选择优化后的培养基成分, 进行摇瓶验证试验。试验设 3 个重复, 比较实测值与理论值。

1.7 30 L 发酵罐放大发酵试验

配置 2.0 L 优化后的发酵培养基分装到 250 mL 摇瓶中, 选择新鲜的菌种接种培养 48 h 后作为种子液, 以 8%~10% 的接种量无菌接种至 30 L 全自动发酵罐中, 装液量为 20 L。发酵参数为: 转速 300 r/min, 温度 30°C, 空气流速 10 L/min~15 L/min。在发酵时间 0~120 h 内, 每隔 12 h 记录和测定 pH 值、DO(Dissolved oxygen)值、总糖^[8]、还原糖^[8]、氨基酸^[9]和星形孢菌素含量变化。

2 结果与分析

2.1 培养温度

发酵培养温度的选择如图 1 所示。28°C 摇瓶培养 108 h, 星形孢菌素含量达到最大值为 32.53 μg/mL, 30°C 摇瓶培养 96 h 达到最大值为 47.18 μg/mL, 32°C 摇瓶培养 84 h 达到最大值为 29.81 μg/mL。比较 3 个温度得知, 在 30°C 条件下菌株产生星形孢菌素的水平最高, 选择 30°C 为放线菌 H41-28 的最适摇瓶培养温度。

2.2 发酵培养基成分优化

2.2.1 碳氮源因子的选择: 由图 2 可知, 选择不同碳源的发酵效价为: 葡萄糖 30.72 μg/mL、蔗糖 43.59 μg/mL、米粉 54.37 μg/mL、可溶性淀粉 40.83 μg/mL、玉米淀粉 67.73 μg/mL。分析表明: 选择玉米淀粉时星形孢菌素含量显著高于其它碳源, 玉米淀粉为最适发酵碳源。

如图 3 所示, 分别选择酵母粉、牛肉膏、大豆蛋白粉、鱼粉和玉米浆和蛋白胨为氮源时, 发酵效价为 102.54 μg/mL、61.75 μg/mL、63.45 μg/mL、

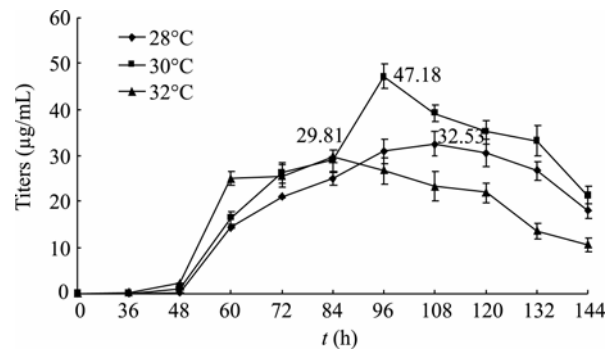


图 1 不同温度下星形孢菌素效价曲线

Fig. 1 Curves of staurosporine titers in different temperatures

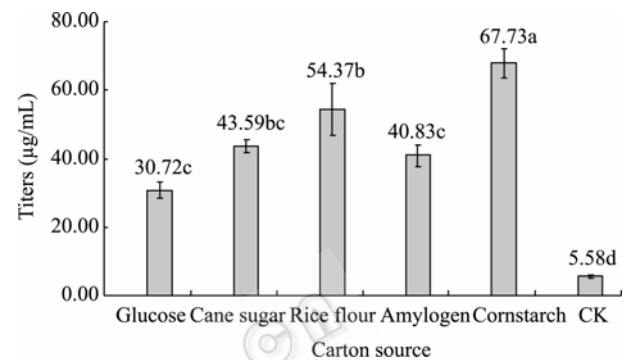


图 2 使用不同碳源时星形孢菌素效价

Fig. 2 Staurosporine titers with different carbon source

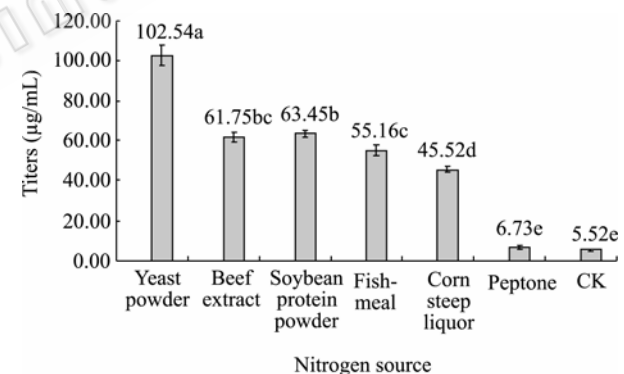


图 3 使用不同氮源时星形孢菌素效价

Fig. 3 Staurosporine titers with different nitrogen source

55.16 μg/mL、45.52 μg/mL 和 6.73 μg/mL。统计表明: 选择酵母粉时星形孢菌素效价显著高于其它氮源, 酵母粉为最适氮源。

2.2.2 部分因子试验优化培养基组分: 由 SAS 软件调出实验设计表, 其中影响因子 X_1 、 X_4 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{12} 为空项, 影响因子 X_2 、 X_3 、 X_5 、 X_6 、 X_8 、 X_9 、 X_{11} 、 X_{13} 分别代表玉米淀粉、酵母粉、粗盐、 CaCO_3 、 KNO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。试验设计及处理结果如表 1 所示。

表 1 部分因子试验设计及结果
Table 1 Experimental design and results of FFD

Treatments	Factors													Titers($\mu\text{g/mL}$)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	
1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	91.45
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	87.08
3	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	129.64
4	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	80.78
5	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	187.06
6	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	62.20
7	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	128.50
8	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	237.10
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	120.43
10	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	73.58
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	127.07
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	158.52
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	137.70
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	173.69
15	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	189.15
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	114.39

Note: X_2 (-1: 2.00%, 1: 3.00%); X_3 (-1: 1.50%, 1: 2.50%); X_5 (-1: 0.25%, 1: 0.35%); X_6 (-1: 0.15%, 1: 0.25%); X_8 (-1: 0.1%, 1: 0.3%); X_9 (-1: 0.06%, 1: 0.12%); X_{11} (-1: 0.05%, 1: 0.09%); X_{13} (-1: 0.002%, 1: 0.004%).

回归分析由表 2 可知, 酵母粉和粗盐是主要的影响因素, 二者在大于 90% 的概率水平上差异显著, 其它 6 个因素在 90% 的概率水平上差异不显著, 其中酵母粉为正影响(t 值为正), 粗盐为负影响(t 值为负)。

2.2.3 爬坡路径试验: 爬坡路径试验设计及结果如表 3 所示, 3 号培养基的发酵效价最大, 为 246.36 $\mu\text{g/mL}$ 。此时 3 号培养基中 X_3 (酵母粉)为 3.50%、 X_5 (粗盐)为 0.25%。

2.2.4 响应分析法优化: 采用 SAS 的 REREG(响应面回归)对表 4 所得数据进行分析, 回归分析结果列于表 5。试验数据拟合所得二次多项式方程: $Y =$

表 3 最陡爬坡路径试验设计及结果
Table 3 Experimental design and results of steepest ascent

Treatments	X_3 (%)	X_5 (%)	Titers ($\mu\text{g/mL}$)	Treatments
1	2.50	0.35	206.47	1
2	3.00	0.30	222.56	2
3	3.50	0.25	246.36	3
4	4.00	0.20	225.83	4
5	4.50	0.15	212.62	5
6	5.00	0.10	190.32	6

Note: The average titers are the average of three replicates.

$247.1600 - 0.8576X_3 - 17.9796X_5 - 7.2663X_3^2 - 4.5475 X_3X_5 - 16.0188 X_5^2$, 方差来源(模型、线性回归部分、平方项增加部分)的 F 值在 0.05 水平上差异显著。决定系数 $R^2 = 0.9620$, 表明模型能解释 95% 效价的变化, 回归拟合程度好。响应面的规范形如图 4 所示, 表明回归模型中 Y 对于不同培养基的成分含量(X_3 、 X_5)具有最大值, 其预测值为 252.31, 最大值时 X_3 、 X_5 的取值为 3.54% 和 0.23%。

优化后培养基组分含量如下: 玉米淀粉 3.00%、酵母粉 3.54%、粗盐 0.23%、 CaCO_3 0.15%、 KNO_3 0.10%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.09%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, 水 1000 mL, pH 7.2~7.4。

表 2 部分因子试验回归分析
Table 2 Results of regression analysis of FFD

Factor notations	Factors	t value	$Prob> t $	Important sorting
X_2	Cornstarch	2.0880	0.1720	3
X_3	Yeast power	3.2517	0.0830	2
X_5	Crude salt	-4.2037	0.0522	1
X_6	CaCO_3	-1.6552	0.2397	5
X_8	KNO_3	-0.8154	0.5005	6
X_9	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-1.9931	0.1844	4
X_{11}	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.1379	0.9029	7
X_{13}	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-0.1348	0.9051	8

表 4 响应分析法试验设计及结果
Table 4 Experimental design and results of RS A

Treatments	Factors		Titers(μg/mL)
	X ₃	X ₅	
1	-1	-1	241.12
2	-1	1	214.14
3	1	-1	240.52
4	1	1	195.35
5	-1.41421	0	229.29
6	1.41421	0	238.15
7	0	-1.41421	241.56
8	0	1.41421	190.87
9	0	0	247.16
10	0	0	248.31
11	0	0	250.59
12	0	0	247.37
13	0	0	248.28

Note: X₃(-1.41421: 2.69%; -1: 3.00%; 0: 3.50%; 1: 4.00%; 1.41421: 4.21%), X₅(-1.41421: 0.18%; -1: 0.20%; 0: 0.25%; 1: 0.30%; 1.41421: 0.32%).

表 5 响应面分析试验回归分析
Table 5 Results of regression of RSA

Regression	Degree of freedom	Sum of squares	F value	Pr>F
Total Model	5	3463.09	15.17	0.0243
Linear	2	2592.00	28.39	0.0112
Quadratic	2	788.39	8.64	0.0469
Crossproduct	1	82.72	1.81	0.2709
Total Error	3	136.93		

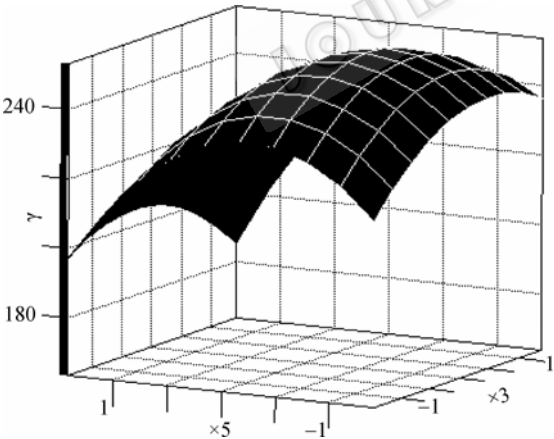


图 4 Y = f(X₃, X₅)的响应分析面
Fig. 4 Surface response plot of the function Y = f(X₃, X₅)

2.2.5 验证试验结果: 由表 6 可知, 实测值为 251.28 μg/mL, 理论值为 252.31 μg/mL, 显著性分析表明实测值与理论值差异不显著, 说明模型的有效性和拟合性很好。

表 6 模型验证试验
Table 6 Test experiment of the response surface model

Treatments	Titers(μg/mL)
Theoretical value	252.31 ± 0.00a
Measured value	251.28 ± 1.42a

Note: The data are the average of three replicates. The last same letters in each column indicates that the difference is not statistically significant by DMRT at P = 0.05.

2.3 30 L 发酵罐放大发酵试验

选择优化后的发酵培养基进行 30 L 发酵罐放大试验, 试验过程中相关参数变化如图 5~7 所示。

1) DO 值: 发酵前期由于培养基粘度大, 孢子开始萌发, DO 值较低。随着培养基营养成分被分解利用, 培养基通透性增强, DO 值出现上升为 71.3%, 但是随着菌体营养生长不断消耗氧, DO 值迅速下降为 39.6%, 48 h~96 h 之间 DO 值都维持在较为恒定的水平。96 h 后 DO 值开始上升为 75.3%, 菌体生长耗氧量下降, 菌体代谢自溶。2) pH 值: 随时间缓慢上升, 至发酵后期为弱碱性(6.4~8.3)。3) 总糖: 菌体生命活动的需要, 总糖含量一直呈现下降趋势, 由最初的 37.67 mg/mL 下降到 16.14 mg/mL。4) 还原糖: 在接种的最初 12 h 内, 菌体萌发直接消耗培养液中原有的还原糖, 使含量迅速下降为 1.2 mg/mL, 然后由于碳源不断分解为还原糖供菌体生长需要, 使其又迅速上升到 2.66 mg/mL, 然后维持在比较稳定的水平。5) 氨基氮: 发酵初期其含量较低(0.22 mg/mL), 发酵后期菌体自溶, 自身的蛋白酶将一些菌体蛋白水解为多肽与氨基酸, 造成培养液中氨基氮浓度增加到 0.76 mg/mL。6) 星形孢菌素: 发酵前期由于菌体处于营养生长阶段, 代谢产物较少, 48 h 后菌体发酵单位直线上升, 在 84 h 发酵单位达到最大值 286.44 μg/mL。

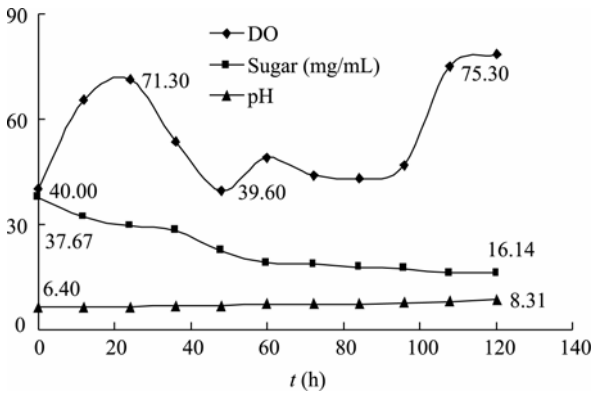


图 5 DO、pH 值和总糖变化曲线
Fig. 5 The curve of PO₂, pH and sugar

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

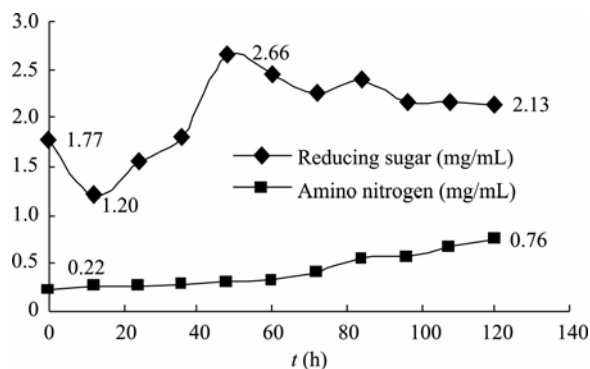


图6 还原糖和氨基氮变化曲线

Fig. 6 The curve of reducing sugar and amino nitrogen

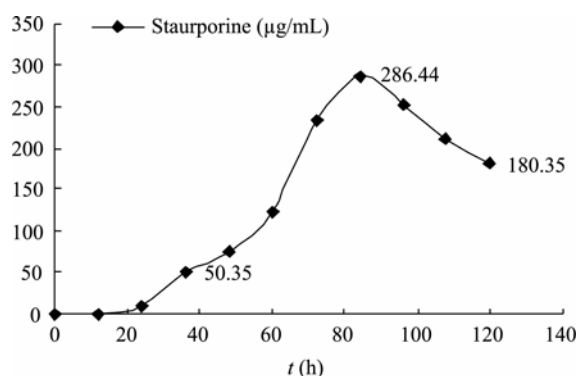


图7 星形孢菌素变化曲线

Fig. 7 The curve of staurosporine

3 讨论

影响发酵的因素包括培养基成分(如碳源、氮源、无机盐、生长因子等)、培养温度、pH 值、转速等。培养基传统的优化方法是单次单因子法^[10],即在因素间不存在交互作用的假设下,保持其它因素不变,一次改变一个因素的水平,逐个因素进行考察。这种方法不仅费时,而且有可能导致对系统行为的不全面的反映^[11]。由于因素间常存在交互作用,这种方法可能得出不可靠甚至错误的结论。完全的因子试验常常是由于经济、时间和其它条件的限制是无法进行的,因此部分因子试验(Fractional factorial design)广泛地被应用^[12-14]。Fractional factorial 设计特别考虑了因素之间的交互作用,而且因素之间的联合作用可以通过 Fractional factorial 设计和响应面分析法来确定。响应面分析方法是一种用来寻找多因子变量系统优化条件的实验设计方法,已经广泛应用于培养基成分的优化^[15-18]。本实验采用 Fractional factorial 设计确定发酵培养基的

重要影响因子,然后由爬坡路径实验逼近最大响应区域,最后进行响应分析法求出重要因素的最佳水平,得到最大响应值。海洋放线菌 H41-38 在初始发酵培养基(30°C、96 h)的效价为 47.18 μg/mL,培养基经过优化后,发酵单位上升到 251.28 μg/mL,发酵水平提高了 4.33 倍。在 30 L 发酵罐中的发酵效价水平为 286.44 μg/mL,比摇瓶培养效价提高了 45.16 μg/mL,培养时间缩短了 12 h,且比国内外报道的最高水平提高了 1.18 倍。

本文研究了 30 L 发酵罐中发酵过程的一些参数变化,如 pH、溶氧值、总糖、还原糖、氨基氮和星形孢菌素含量。分析 pH 值和氨基氮含量升高的原因为发酵后期菌体自溶,自身的蛋白酶将一些菌体蛋白水解为多肽与氨基酸。星形孢菌素含量在 84 h 最高,84 h 后由于产物合成达到一定量时会抑制其继续产生,且会被相关酶或化学反应降解,从而发酵液中抗生素含量会随时间增长而逐渐降低。

参考文献

- [1] 刘妍,李志勇. 海洋放线菌研究的新进展. 生物技术通报, 2005, 6: 34-39.
- [2] 蒲小明,林璧润,胡美英,等. 链霉菌 4138 杀虫成分及对甜菜夜蛾的毒力测定. 中国生物防治, 2008, 24(2): 163-167.
- [3] Omura S, Iwai Y, Hiram A, et al. A new alkaloid AM-22282 of streptomyces origin, Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *Journal of Antibiotics*, 1977, 30: 275-282.
- [4] Schroeder DR, Lam KS, Mattei JM, et al. Manufacture of staurosporine with *Streptomyces hygroscopicus*. US4973552, 1990.
- [5] Tanida S, Takahashi T, Tsuboya S, et al. Staurosporine-type antibiotic TAN-1030A, derivatives thereof, and their manufacture with *Streptomyces*. JP 01246288, 1989.
- [6] Omura S, Iwai Y, Hiram A. Antibiotic AM-2282. DE 2754326, 1978.
- [7] 蒲小明,林璧润,胡美英,等. 星形孢菌素产生菌选育研究. 核农学报, 2008, 22(3): 276-279.
- [8] 叶海辉,何秀芬,王秀兰,等. 费林试剂滴定法测定还原糖方法的改进. 热带农业科学, 2001, 6(3): 9-11.
- [9] 苗敬芝. 酱油中氨基氮测定方法的探讨. 中国调味品, 2000, 6: 27-29.
- [10] Gigras PG, Sahai V, Gupta R. Statistical media optimization and production of ITS α-amylase from *Aspergillus*

- [10] *oryzae* in a bioreactor. *Current Microbiology*, 2002, **45**: 203–208.
- [11] Haaland PD. Experimental design in biotechnology. New York: Marcel Dekker Inc., 1989, pp.1–18.
- [12] Patricia M, Pedro C, Paola P, *et al.* Medium optimization by a fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Fermentation and Bioengineering*, 1993, **76**(2): 94–97.
- [13] Tang X, He GQ, Chen QH, *et al.* Medium optimization for the production of thermal stable b-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 2004, **93**: 175–181.
- [14] Zhuang YQ, Chen B, Chu J, *et al.* Medium optimization for meilingmycin production by *Streptomyces nanchangensis* using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 2006, **41**: 405–409.
- [15] Roseiro JC. Medium development for xanthan production. *Process Biochemistry*, 1992, **27**: 167–175.
- [16] Souza M, Roberto I. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Applied Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 768–772.
- [17] 刘忠, 杨文博, 孙丹, 等. 酶法生产 L-半胱氨酸培养基的响应面分析优化. 南开大学学报(自然科学版), 2004, **37**(1): 83–87.
- [18] 邓立红, 张扬, 马润宇, 等. 采用响应面法优化木糖醇发酵培养基. 食品与发酵工业, 2005, **31**(6): 59–61.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、名师名课(原名师讲堂)、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxwtb.cn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件。详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 4 页以内, 研究报告 4~7 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出,多于3人时列出前3人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.1699)

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>